

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

548408

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局



(43)国際公開日  
2004年9月23日 (23.09.2004)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 2004/080491 A1

(51)国際特許分類7:

A61K 49/00

(21)国際出願番号:

PCT/JP2004/002973

CORNING TORAY SILICONE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-0005 東京都 千代田区 丸の内一丁目一番三号 Tokyo (JP).

(22)国際出願日: 2004年3月8日 (08.03.2004)

(71)出願人および

(25)国際出願の言語:

日本語

(72)発明者: 武田 元博 (TAKEDA,Motohiro) [JP/JP]; 〒981-3134 宮城県 仙台市 泉区桂三丁目 15-2 Miyagi (JP). 大内 憲明 (OHUCHI,Noriaki) [JP/JP]; 〒981-0933 宮城県 仙台市 青葉区柏木二丁目 3-17-3 O 2 Miyagi (JP). 川添 良幸 (KAWAZOE,Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒989-3204 宮城県 仙台市 青葉区南吉成二丁目 19-2 4 Miyagi (JP). 紫谷 厚生 (KASUYA,Atsuo) [JP/JP]; 〒981-3122 宮城県 仙台市 加茂 1丁目 13番 5号 Miyagi (JP).

(26)国際公開の言語:

日本語

(74)代理人: 志賀 正武, 外 (SHIGA,Masatake et al.); 〒104-8453 東京都 中央区 八重洲 2丁目 3番 1号 Tokyo (JP).

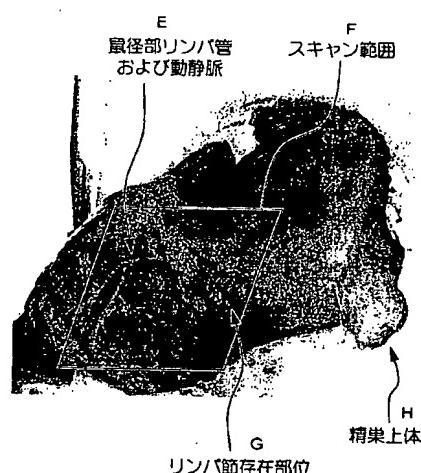
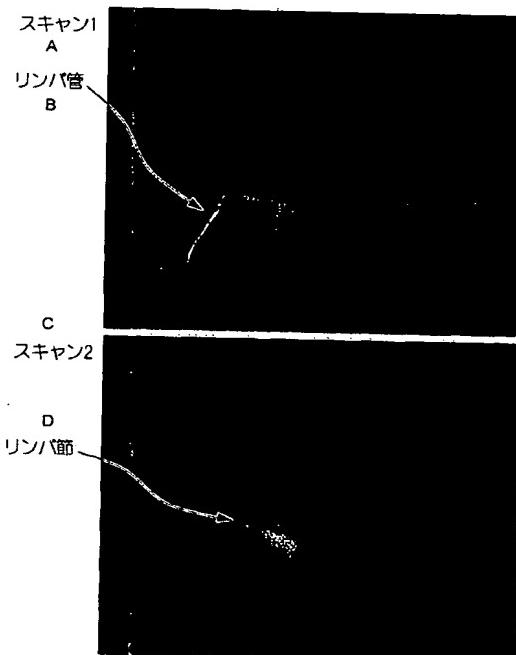
(30)優先権データ:  
特願2003-63753 2003年3月10日 (10.03.2003) JP

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 佐竹正延 (SATAKE,Masanobu) [JP/JP]; 〒989-3204 宮城県仙台市 青葉区南吉成五丁目 9-15 Miyagi (JP). 東レ・ダウコーニング・シリコーン株式会社 (DOW

[統葉有]

(54) Title: AGENT FOR DETECTING SENTINEL LYMPH NODE AND DETECTION METHOD

(54)発明の名称: センチネルリンパ節検出剤及び検出方法



(57) Abstract: A method of detecting a sentinel lymph node characterized in that sentinel lymph node biopsy is carried out by using fluorescent particles having a definite particle diameter to thereby easily and quickly detect the sentinel lymph node.

(57)要約: 本発明は、所定の粒径を有する蛍光粒子を用いてセンチネルリンパ節生検を行うことにより、容易且つ迅速にセンチネルリンパ節を検出可能とすることを特徴とする。

\* 40nm beadsは30分以内にリンパ管、リンパ節が造影された。

- A...SCANNING 1
- B...LYMPH CHANNEL
- C...SCANNING 2
- D...LYMPH NODE
- E...GROIN LYMPH CHANNEL AND ARTERIOVENUS
- F...SCANNING RANGE
- G...LYMPH NODE SITE
- H...PARORCHIS
- I...\*USING 40 nm beads, A LYMPH CHANNEL AND A LYMPH NODE WERE IMAGED WITHIN 30 MIN.

WO 2004/080491 A1



- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,

SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

## センチネルリンパ節検出剤及び検出方法

## 技術分野

本発明は、センチネルリンパ節検出剤及び当該検出剤を用いたセンチネルリンパ節検出方法に関する。

## 背景技術

近年、腫瘍の早期発見率の向上に伴い、早期癌の切除手術が増加している。一般に、腫瘍細胞はリンパ管に侵入し、リンパ液の流れに乗ってリンパ節に転移し、更に他臓器に転移する傾向があるので、早期癌の手術においても、腫瘍細胞の転移を回避するために、腫瘍部分だけでなく当該腫瘍部分の周囲のリンパ節をも切除することが多い。そして、切除したリンパ節の病理検査によって、リンパ節への腫瘍細胞の転移の有無を判定し、手術の成否及び治療方針の策定等が行われている。

過去においては、リンパ節への腫瘍細胞の転移の有無を確認する手段がなかったため、どの程度のリンパ節を切除する必要があるかの判定が困難であった。そこで、腫瘍の転移のリスクを最小限とするために、腫瘍細胞周囲の多くのリンパ節が切除されていた。多数のリンパ節の切除は患者にとっての負担が大きいものであった。

しかし、最近になって、早期乳癌等の腫瘍の場合にはリンパ節への転移が少ないことが明らかとなった。そこで、現在では、センチネルリンパ節生検という新しい術式を採用することによってリンパ節の切除を最小限とする試みがなされている。例えば、乳癌の場合は、センチネルリンパ節生検の結果によっては、腫瘍細胞が最も転移しやすいと考えられている脇の下の腋窩リンパ節の切除等を省略することが提案されている。

以下、センチネルリンパ節生検について説明する。センチネルリンパ節生検とは、例えば、癌の原発腫瘍からリンパ管に入った腫瘍細胞等が、生体の

リンパ系に侵入した物体が最初に到達するリンパ節である、センチネルリンパ節に転移があるか否かを検出する検査法である。

生体のリンパ系に侵入した物体が腫瘍細胞である場合を例に挙げてより具体的に説明する。腫瘍細胞がリンパ節に転移する場合はランダムに転移するのではなく、一定のパターンに従うことが最近明らかとなっている。具体的には、原発腫瘍からリンパ管への腫瘍細胞の侵入後に、当該リンパ管への侵入位置から最も近いリンパ節（センチネルリンパ節）への転移が発生し、更に、当該リンパ節に最も近い他のリンパ節への転移が発生する。そして、この転移が繰り返されるのである。したがって、腫瘍細胞がリンパ節に転移している場合には、必ず、センチネルリンパ節に転移があると考えられる。なお、「センチネル」とは「歩哨」、「前哨」又は「見張り」の意味である。

したがって、例えば、早期癌の切除手術中にセンチネルリンパ節生検を行うことによってセンチネルリンパ節を発見・摘出し、これを直ちに病理検査することによって、リンパ節への腫瘍細胞の転移の有無を判定することができる。そして、センチネルリンパ節への腫瘍細胞の転移がなければ、追加のリンパ節の切除を回避することができる。例えば、乳癌の場合は腋窩リンパ節郭清（切除）を省略することができる。一方、センチネルリンパ節への腫瘍細胞の転移が確認される場合は、転移状況に応じて、センチネルリンパ節が含まれる生体領域、及び、さらにリンパ液流からみてセンチネルリンパ節の下流側の複数のリンパ節が含まれる生体領域が切除される。

このように、センチネルリンパ節生検によって、リンパ節に腫瘍細胞が転移していない患者は無用なリンパ節切除を回避できるので手術の身体的負担が軽減される。この手法は、乳癌に限らず、他の臓器腫瘍の切除手術においても適用可能なものである。

ところで、センチネルリンパ節生検は腫瘍摘出手術等の他の手術中に実施されるので、全手術時間の制限のために、センチネルリンパ節生検ではセンチネルリンパ節を容易且つ迅速に特定する必要がある。そこで、現在、大きく分けて2種類の検出方法がセンチネルリンパ節の特定に使用されている。

最初の検出方法は、手術時に、イソスルファンブルー等の色素を腫瘍の周囲に局所注入する方法（いわゆる「色素法」）である。注入は経皮的な注射、内視鏡等を用いて行うことができる。注入された色素は注入部位からリンパ管に侵入し、数分乃至十数分でセンチネルリンパ節に到達する。したがって、最初に染色されたリンパ節を視認することによって、センチネルリンパ節を同定することができる。

しかし、リンパ節は脂肪等の生体組織に覆われていることが多く、生体組織の剥離を行いながらセンチネルリンパ節を検索することができる。この場合、検索に時間を要すると、その間に色素がセンチネルリンパ節より下流のリンパ節に到達してしまい、センチネルリンパ節の検出が困難となるおそれがある。また、この方法では、体外からセンチネルリンパ節を同定することはできない。さらに、色素の種類によっては、稀であるが、患者にアレルギー反応が起こることもある。

第2の検出方法は、手術前に、テクネシウム等の寿命の短いラジオアイソotope（放射性同位元素：R I）を腫瘍周囲に少量局所注入する方法（いわゆる「アイソotope法」）である。最初の方法と同様に、注入は経皮的な注射、内視鏡等を用いて行うことができる。注入されたラジオアイソotopeは注入部位からリンパ管に侵入し、一定時間センチネルリンパ節に留まる。したがって、手術中に、ガンマプローブを用いてガンマ線量を測定することにより、放射ガンマ線量の最も多いリンパ節をセンチネルリンパ節として同定することができる。

この方法では、ラジオアイソotopeが短時間でセンチネルリンパ節を通過することではなく、また、生体組織に覆われたセンチネルリンパ節を検出することも可能なので、センチネルリンパ節検出の精度が高い。しかしながら、高価なラジオアイソotope及びガンマプローブを使用するために手術システムが複雑となり、R Iを取り扱うこのとのできる大規模な病院以外での実施が困難である。また、ガンマプローブによる検出では、放射線の放射状態を画像化できないために、手探りの状態でリンパ節を検査する必要があり手間

を要する。

## 発明の開示

本発明は、上記の従来技術の問題を解決することをその課題とする。具体的には、体外からのセンチネルリンパ節の同定が可能で、且つ、上記色素法及びアイソトープ法に比較してセンチネルリンパ節をより容易且つ迅速に特定することの可能な検出剤及び当該検出剤を用いたセンチネルリンパ節の検出方法を提供することを目的とするものである。

本発明の目的は、所定の粒径を有する蛍光粒子を用いてセンチネルリンパ節生検を行うことによって達成される。

例えば、ヒトの場合は、200 nm以上1000 nm以下の粒径の蛍光粒子をセンチネルリンパ節検出剤として使用し、ヒト以外の小型哺乳動物の場合は40 nm以上200 nm未満の粒径の蛍光粒子をセンチネルリンパ節検出剤として使用する。

前記蛍光粒子は、励起エネルギーの照射後に、600～900 nmの波長の蛍光を放射する粒子であることが好ましい。なお、前記蛍光粒子の表面の少なくとも一部或いは全部がオルガノポリシロキサンから構成されてもよい。

具体的には、本発明のセンチネルリンパ節検出方法は、  
蛍光粒子を生体内に注入する工程；

前記注入箇所付近、特にリンパ節存在部分、に励起エネルギーを照射する工程；及び

前記蛍光粒子から放射される蛍光を検出する工程  
を含むことを特徴とする。小型哺乳動物（ヒトを除く）の場合は40 nm以上200 nm以下の粒径の蛍光粒子を、そして、ヒトの場合は200 nm以上1000 nm以下の粒径の蛍光粒子を使用することが好ましい。

## 図面の簡単な説明

図1は後述する実施例1で得られたCCDカメラ画像である。

図2は後述する比較例1で得られたCCDカメラ画像である。

### 発明を実施するための最良の形態

本発明のセンチネルリンパ節検出では、所定範囲内の粒径を有し、且つ、励起後に蛍光を発する粒子を、ヒト又は小型哺乳動物（ヒトを除く）の生体内リンパ液流に導入し、当該粒子が最初に到達するリンパ節をセンチネルリンパ節として同定することを大きな特徴としている。なお、本発明において小型哺乳動物とはヒト以下のサイズを有する哺乳動物を指し、例えば、ラット、犬、猫、猿、豚、ヤギ、兎、羊等を挙げることができる。

ヒト及び小型哺乳動物（ヒトを除く）体内的リンパ系は、動物種に応じて固有の物質運搬及びフィルター機能を備えたリンパ管及びリンパ節を有しており、ヒトの場合は約200nm以上、ヒト以外の小型哺乳動物（例えばラット）の場合は約40nm以上の粒径を有する物体はリンパ節をそのまま短時間に通過することができない。したがって、生体内のリンパ液流によってあるリンパ節に到達したものの、そこを通過できない巨大粒子は当該リンパ節に貯留することになる。

したがって、例えばヒトの場合は、ヒト体内の腫瘍周囲に200nm以上の粒径を有する粒子を注入し、そのリンパ液流による移動を追跡し、当該粒子の貯留しているリンパ節を検出すれば、当該リンパ節をセンチネルリンパ節として同定することができる。ヒト以外の小型哺乳動物の場合は、粒子の粒径を減少させ、40nm以上とすることによって、同様に、センチネルリンパ節の検出を行うことができる。200nm未満（ヒト）或いは40nm未満（ヒト以外の小型哺乳動物）のサイズの粒子を使用すると、当該粒子は生体内のリンパ節に貯留せずに、短時間でリンパ液の下流側に流出するので手術時間中十分にセンチネルリンパ節を検出することができない（なお、この場合であっても、リンパ管の造影については可能である）。

ただし、生体のリンパ系に導入される粒子の粒径が過大であると、リンパ管内の粒子の移動に時間を要し、手術時間中にセンチネルリンパ節の検出を

行うことが困難となるので、センチネルリンパ節検出剤としての粒子の粒径には自ずと上限が存在する。この上限値は、ヒトの場合は約1000nm以下であり、ヒト以外の小型哺乳動物では約200nm未満である。

したがって、本発明のセンチネルリンパ節検出剤粒子の粒子径は、小型哺乳動物（ヒトを除く）の場合は約40nm以上約200nm未満であり、ヒトの場合は約200nm以上約1000nm以下である。ヒトの場合、上記粒子径は、好ましくは300nm以上800nm以下、より好ましくは400nm以上700nm以下、特に好ましくは500nm以上600nm以下である。一方、ヒト以外の小型哺乳動物では、上記粒子径は、好ましくは40nm以上150nm以下、より好ましくは40nm以上100nm以下、特に好ましくは40nm以上80nm以下である。なお、本発明において「粒子」とは完全な球体以外に、橢円球等の不完全な球体形状を有する物体をも含む。完全な球体以外の粒子の場合、粒径とは、当該粒子の最長サイズ方向長さを意味する。

本発明のセンチネルリンパ節検出用粒子は、全ての粒子が均一の粒径を有していてもよく、或いは、上記の粒径範囲内で所定の粒度分布を有していてもよい。ただし、前記粒子のセンチネルリンパ節到達時間は粒径に依存するので、到達時間の制御のためには、全ての粒子がほぼ均一の粒径を備えることが好ましい。

本発明のセンチネルリンパ節検出剤として使用される粒子は、励起エネルギーの照射後に蛍光を発する性質を有する蛍光粒子である。励起エネルギーの種類としては特に制限はなく、熱、磁場、光等を挙げることができるが、特に光が好ましく、特に、蛍光波長より短波長のレーザー光を照射することができる。レーザー光としては、ダイオードレーザー、He-Neレーザー等からのレーザー発振装置からの発振光を使用することができる。

本発明のセンチネルリンパ節検出剤としての粒子から発せられる前記蛍光の波長は600～900nmの範囲が好適である。600nmより蛍光波長が短いと生体内に自然に存在する蛍光物質（ポルフィリン等）が発する蛍光

(自家蛍光) の波長と重複するので高感度測定が困難となる。一方、900 nmより蛍光波長が長いと、利用可能な蛍光粒子の種類が僅かとなり実用上好ましくない。なお、好ましい蛍光波長は620～800 nmであり、より好ましい蛍光波長は650～700 nmであり、特に好ましい蛍光波長は660～680 nmである。

したがって、センチネルリンパ節検出用蛍光粒子の蛍光波長が600～900 nmの範囲の場合は、励起エネルギー光の波長は600 nm未満が好ましい。同様に、蛍光波長が620～800 nmの範囲の場合は、励起エネルギー光の波長は620 nm未満が好ましく、また、蛍光波長が650～700 nmの範囲の場合は、励起エネルギー光の波長は650 nm未満が好ましく、そして、蛍光波長が660～680 nmの範囲の場合は、励起エネルギー光の波長は660 nm未満が好ましい。一般に、蛍光ピーク波長より20～30 nm短い波長に励起エネルギー光の吸収ピークが存在するが、検出される蛍光と励起エネルギー光との重複を回避して蛍光検出を容易に行うためには、さらに短い波長で蛍光物質の励起を行うことが好ましい。

前記蛍光粒子中の蛍光物質は、好ましくは上記の波長範囲の、蛍光を発することが可能な物質を含む限り、無機又は有機系の任意の物質から構成されてもよい。

無機系蛍光物質としては、例えば、3～16族の金属元素からなる蛍光物質、特に希土類金属の化合物が挙げられるが、その蛍光強度の強さから3価のユウロピウム、3価のテルビニウム、3価のサマリウム、3価のジスプロシウム、2価のユウロピウム等の化合物が好ましい。これらは単独で用いてもよく、2種以上併用しても良い。なお、無機系蛍光物質は蛍光波長よりかなり短い波長で励起可能であるため励起光と蛍光が重なりにくい特長を有する。そのため励起波長特性の点では無機系蛍光物質が好ましい。

有機系蛍光物質としては、例えば、フルオレセイン、アクリフラビン、ローダミン、ヨウ化3,3-ジエチルトリカルボシアニン、クロロアルミニウムフタロシアニン、5-カルボキシフルオレセイン、5-(2'

ーアミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸、アントラニルアミド、クマリン、シアニン染料、BODIPY染料等の各種染料が挙げられる。具体的には、酸性フクシン、アクリジンオレンジ、アクリジンレッド、アクリジンイエロー、アクリフラビン、アリザリンレッド、アロフィコシアニン、アミノアクチノマイシンD、7-アミノアクチノマイシンD-AAD、アストラゾン ブリリアント レッド 4G、アストラゾン レッド 6B、アストラゾン オレンジ、アミノクマリン、ステアリン酸アントリル、アタブリン、オーラミン、オーロフォスフィン、オーロフォスフィンG、ベルベリンスルフェート、ビスベンズアミド、CY3.18、CY5.18、CY7、エリスロシンITC、エチディウムブロミド、フラゾオレンジ、FM1-43、ゲナクリル ブリリアント レッドB、ゲナクリル ピンク3G、リサミン ローダミンB200、リソトラッカー イエロー、リソトラッcker レッド、マグダラ レッド、マグネシウム オレンジ、マイスマライシン、ナイル レッド、ニトロベンゾキサジドール、パラロサニリン、フォスフィン3R、フォスフィンR、ポントクローム ブルー ブラック、プリムリン、プロシオン イエロー、ヨウ化プロピジウム、ピロナインB、R-フィコエリシン、ローダミン5 GLD、ローダミン 6G、ローダミン B、ローダミン B200、ローダミン Bエキストラ、ローズベンガル、セロトニン、セプロン ブリリアント レッド2B、スルホローダミン Gエキストラ、チアジン レッドR、チオフラビンS、ウルトラライト、キシレンオレンジ等を挙げることができる。

蛍光粒子中の蛍光物質を担持するマトリックスとしては、無機又は有機系の任意の物質を使用することができる。無機系物質としては、シリカ、タルク、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム、酸化アルミニウム、酸化亜鉛、硫酸バリウム、ガラス、カーボンフラーレン等のフラーレン、カーボンナノチューブ等のナノチューブ、ゼオライト等を挙げができる。有機系物質としてはポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート、ポリアクリルアミド、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン等の

ラジカル重合型ポリマー；ポリエステル、ポリアミド、ポリイミド、ポリカーボネート等の重縮合型ポリマー；ポリウレタン等の重付加型ポリマー；シリコーンゴム等のオルガノポリシロキサン等を挙げることができる。これらの物質のうち、入手容易性の点では有機系物質が好ましく、また、生体内安定性・安全性の点ではポリスチレン等のラジカル重合ポリマー及びオルガノポリシロキサンが好ましい。なお、センチネルリンパ節検出後に、生体内にごく僅か残存する可能性のある蛍光粒子を体内で早期に分解して消滅させる場合は、ポリ乳酸等の各種の生分解生有機ポリマーからマトリックスを構成してもよい。

蛍光粒子として利用可能な市販の製品としては、例えば、Molecular Probes社のポリスチレンマトリックス型蛍光ビーズ（蛍光物質：各種染料）の水中2%懸濁液であるFluoroSphere（登録商標）を挙げができる。

本発明のセンチネルリンパ節検出剤としての蛍光粒子の表面は各種の処理を受けていてもよく、例えば、親水化又は疎水化処理、或いは、各種の官能基導入処理が施されていてもよい。親水化処理としては、プラズマ処理、紫外線処理等を挙げができる。疎水化処理としては、メチルハイドロジエンシロキサン等のオルガノポリシロキサン、ペーフルオロアルキルリン酸エステル等による表面処理が挙げられる。なお、粒子表面に導入されうる官能基としては、これらに限定されるものではないが、カルボキシレート基、スルフェート基、アルデヒドスルフェート基、アミノ基等が挙げられる。

本発明で使用される蛍光粒子は、生体適合性、生体安定性の面から、その表面の少なくとも一部がオルガノポリシロキサンから構成されることが好ましい。具体的には、蛍光粒子のマトリックスをシリコーンゴム等のオルガノポリシロキサンとしてもよく、また、蛍光粒子の少なくとも一部の表面をオルガノポリシロキサンにより表面処理してもよい。なお、蛍光粒子の全表面がオルガノポリシロキサンにより被覆されてもよい。

本発明のセンチネルリンパ節検出方法は、ヒト或いは小型哺乳動物（ヒトを除く）のいずれを対象とするかによって、蛍光粒子の粒径を上記の異なる

数値範囲から選択し、所定の粒径を有する蛍光粒子を生体内に注入し、次に、注入箇所付近に励起エネルギーを照射し、当該蛍光粒子から放射される蛍光を検出することによって実施することができる。

蛍光粒子の発光は強度が大きいために、皮膚上から肉眼で蛍光を観測可能である。したがって、単に蛍光の存在箇所を確認することにより、容易かつ迅速にセンチネルリンパ節を同定することが可能である。もちろん、皮膚を切開した状態で蛍光粒子の発光を追跡することも可能であり、その場合は、より強い蛍光を直接確認することにより、センチネルリンパ節の同定をより容易に行うことができる。

体内に注入される蛍光粒子は粒径が大きい程、センチネルリンパ節への到達時間が長くなるために、手術前の時間が長い場合は、比較的粒径の大きい蛍光粒子を使用することが可能であり、また、短時間でセンチネルリンパ節を同定する必要がある場合は、粒径の比較的小さい蛍光粒子を使用することができる。

励起エネルギー照射領域を制限し、或いは、センチネルリンパ節検出領域を限定するために、蛍光粒子の体内注入前に、リンフォシンチグラフィを実施してもよい。リンフォシンチグラフィにより、事前に、センチネルリンパ節存在領域をある程度予測できるので、当該存在予測領域に励起エネルギー照射を制限することにより、使用エネルギーを節約し、且つ、センチネルリンパ節検出をより迅速且つ確実に行うことが可能となる。

本発明のセンチネルリンパ節検出剤を利用した手術、例えば腫瘍摘出手術、は、以下のように行うことができる。

患者の腫瘍周囲又は腫瘍直上皮下に、上記の蛍光粒子の所定濃度の懸濁液を所定量注入する。原発腫瘍内に注入すると、それによって腫瘍細胞が周囲の臓器に拡散するおそれがあるので好ましくない。注入手段としては、注射器を好適に使用することができる。必要に応じて、蛍光粒子の注入前にリンフォシンチグラフィを腫瘍の周囲で実施してもよい。

適当な時間、例えば10～30分、の経過後、患者のセンチネルリンパ節

生検を開始する。まず、患者の腫瘍周囲に蛍光試薬を注入し、腫瘍存在部位またはセンチネルリンパ節の存在が予想される付近の皮膚を切開し、腫瘍付近の生体組織にレーザー等の励起エネルギーを照射し、これと同時に、蛍光部位を走査する。なお、皮膚癌、乳癌等のように腫瘍が比較的皮下近くに存在する場合は、切開の前にレーザー等の励起エネルギーを腫瘍付近の皮膚に照射し、蛍光部位を確認してもよい。

蛍光により同定されたセンチネルリンパ節を摘出し、直ちに、組織検査を行う。次に、腫瘍摘出が行われるが、組織検査により腫瘍細胞の転移が陰性と判断された場合は腫瘍及びその周囲組織のみを摘出し、切開部位を縫合し、手術を終了する。一方、組織検査により腫瘍細胞の転移が陽性と判断された場合は、腫瘍と共に、腫瘍周囲のリンパ節の一部又は全部を摘出した上で切開部位を縫合し、手術を終了する。

#### 産業上の利用可能性

本発明のセンチネルリンパ節検出剤はアイソトープとは異なり放射能を有さず取り扱いが容易なので、センチネルリンパ節生検用の大規模な設備が不要である。したがって、大規模病院以外であってもセンチネルリンパ節生検を利用した腫瘍摘出手術を行うことができる。このように、センチネルリンパ節生検を利用することにより、不要な生体組織（リンパ節など）摘出を回避して、腫瘍摘出手術時の患者の負担を著しく減少させることができる。また、アイソトープ法とは異なり、本発明ではセンチネルリンパ節が蛍光により画像化されるので、長期の経験を積んだ医師でなくとも容易にセンチネルリンパ節を同定することができる。

本発明でセンチネルリンパ節検出剤として使用される蛍光粒子は、リンパ管を容易に移動することが可能で、且つ、最初に到達したリンパ節を通過できない程度の所定の粒径を有するので、センチネルリンパ節に確実に滞留する。したがって、単に蛍光を発するリンパ節を目視により特定するだけの簡易な操作によってセンチネルリンパ節を確実に同定することができる。

また、短時間内でセンチネルリンパ節を同定する必要がある色素法とは異

なり、本発明ではセンチネルリンパ節の同定により多くの時間を利用することができるので、同定作業を容易且つ確実に行うことができる。なお、本発明では、体外からもセンチネルリンパ節同定が可能なので、色素法に比較して、同定操作を著しく簡略化することができる。

### 実施例

以下、実施例に基づき、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例 1

1匹のラット（Donryu種；雄；7～10週齢）に脱脂綿に染み込ませて氣化させたジエチルエーテル6mlの吸入により麻酔を施し、麻酔が完全にかかるから後に下肢部分を剃毛した。

40nmの単一粒径の蛍光粒子を含むMolecular Probe社製Fluosphere Dark Red原液0.05mlを足背に皮下注射した。次に、下肢部分の皮膚を剥離した。

633nmの波長のレーザー光（Spectra-Physics社製He-Ne装置を使用）を下肢部分に照射し、670±10nmのバンドパスフィルターを装備したCCDカメラ（SONY製）で下肢付け根部分を撮像した。レーザー光照射－撮像の操作を皮下注射から17分後及び28分後に行った。結果を図1に示す。皮下注射から17分後に撮像された図1（a）では蛍光粒子が移動中のリンパ管が造影されており、皮下注射から28分後に撮像された図1（b）では蛍光粒子が集積したセンチネルリンパ節が造影されている。

#### 比較例 1

実施例1において、蛍光粒子の粒径を200nmとした以外は実施例1と同一の操作を行った。結果を図2に示す。図2から明らかのように、注入後1時間以内ではセンチネルリンパ節は造影されなかった。図2の右上の蛍光は精巣上体の自家蛍光による発光現象である。なお、皮下注射から60分経

過後に再度レーザー光照射－撮像の操作を行ったが、センチネルリンパ節は造影されなかった。

図1及び図2から明らかなように、40nmの粒径の蛍光粒子を用いた場合には、センチネルリンパ節を30分以内に同定することができたが、200nmの粒径の蛍光粒子を用いた場合には、1時間以内にセンチネルリンパ節の同定はできなかった。

## 請求の範囲

1. 200 nm以上1000 nm以下の粒径の蛍光粒子からなるヒト用センチネルリンパ節検出剤。
2. 40 nm以上200 nm未満の粒径の蛍光粒子からなる小型哺乳動物（ヒトを除く）用センチネルリンパ節検出剤。
3. 前記蛍光粒子が、600～900 nmの波長の蛍光を放射することを特徴とする、請求項1又は2記載のセンチネルリンパ節検出剤。
4. 前記蛍光粒子表面の少なくとも一部がオルガノポリシロキサンからなることを特徴とする、請求項1乃至3のいずれかに記載のセンチネルリンパ節検出剤。
5. 40 nm以上200 nm未満の粒径の蛍光粒子を小型哺乳動物（ヒトを除く）の生体内に注入する工程；  
前記小型哺乳動物の前記注入箇所付近に励起エネルギーを照射する工程；及び  
前記蛍光粒子から放射される蛍光を検出する工程  
を含むことを特徴とする小型哺乳動物（ヒトを除く）センチネルリンパ節検出方法。

1/2



\*40nm beadsは30分以内にリンバ管、リンバ節が造影された。

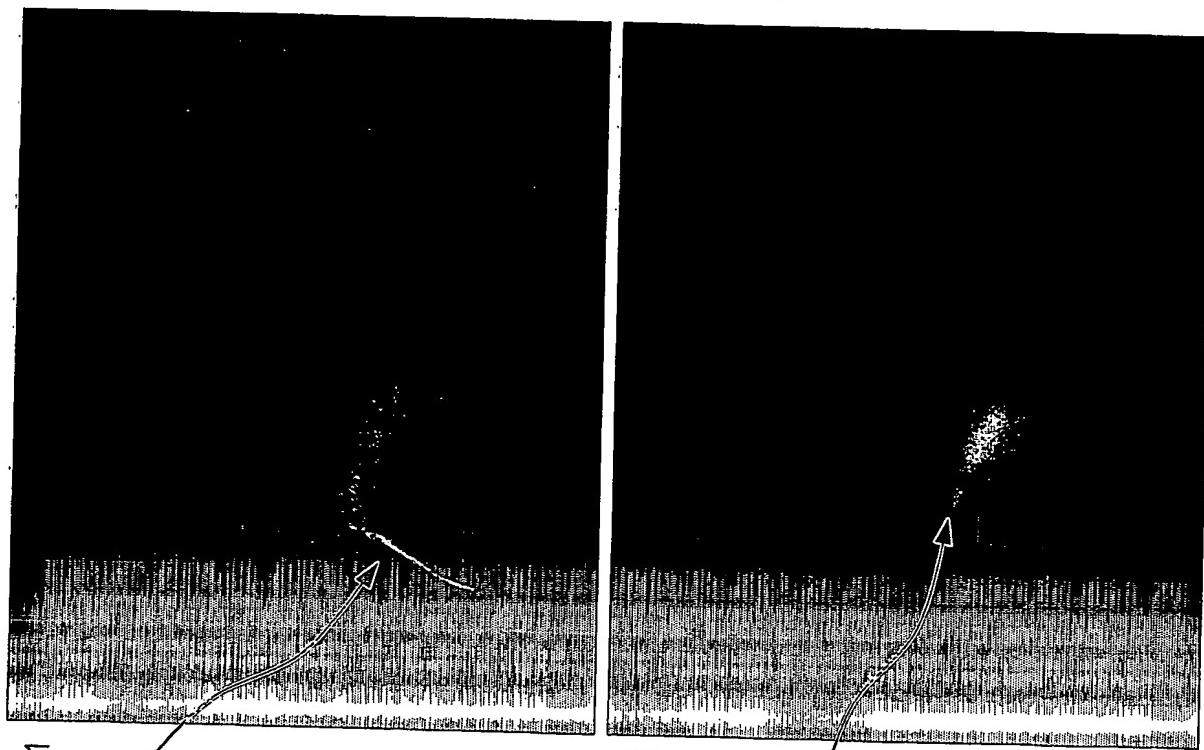
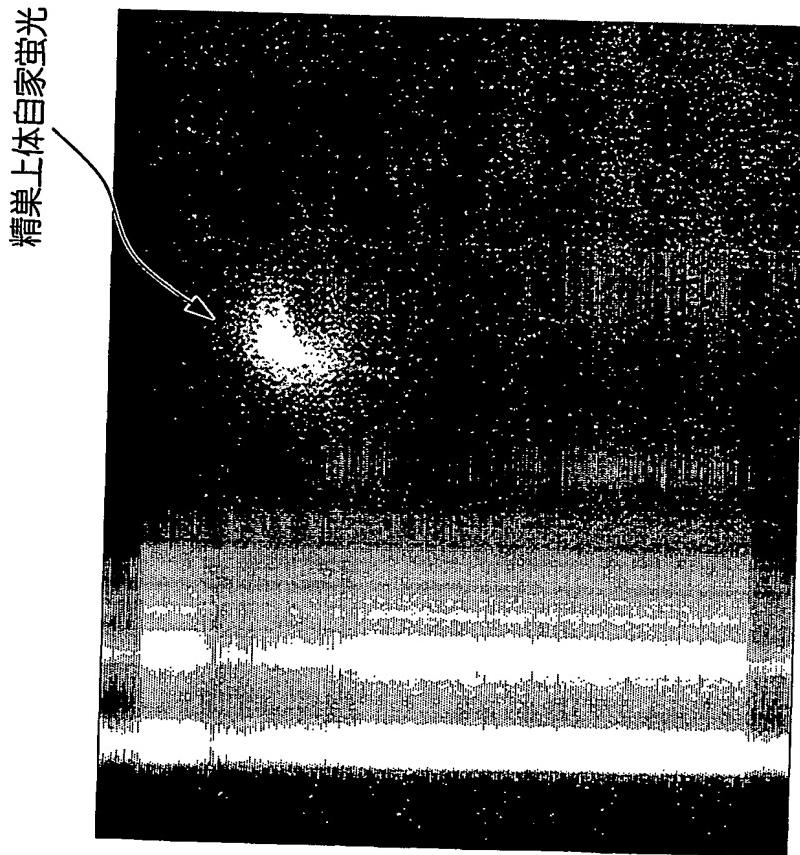
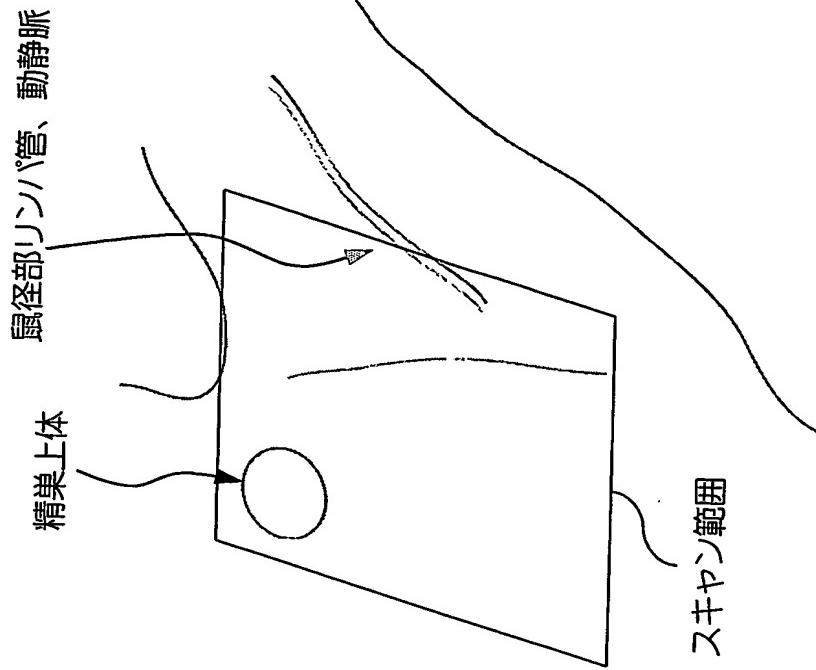


図1  
スキャン

2/2

図 2



\* 直径200nmビーズは60分まで待っても造影されなかつた。

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/002973

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> A61K49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> A61K49/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004  
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
 CAPLUS (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KERSEY, Terry W. et al., Comparison of intradermal and subcutaneous injections in lymphatic mapping, Journal of Surgical Research, 2001, Vol.96, pages 255 to 259, full text; particularly, page 255, abstract	1-4
Y	JP 4-506078 A (Alliance Pharmaceutical Corp.), 22 October, 1992 (22.10.92), Full text; particularly, Claims 1 to 21; page 2, lower left column, line 3 to upper left column; page 5, upper right column & WO 90/14846 A1	1-4

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 May, 2004 (07.05.04)

Date of mailing of the international search report  
25 May, 2004 (25.05.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002973

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TAFRA, Lorraine et al., Filtered versus unfiltered technetium sulfur colloid in Lymphatic mapping: a significant variable in a pig model, Annals of Surgical Oncology, 1999, Vol.6, pages 83 to 87; full text	1-4
A	JP 7-509467 A (The General Hospital Corp.), 19 October, 1995 (19.10.95), Full text & WO 94/02068 A1	1-4

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/002973

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 5

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 5 pertains to methods for treatment of the human body by diagnosis and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required to search.

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' A61K49/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl' A61K49/00

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN)	EMBASE(STN)
MEDLINE(STN)	BIOSIS(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	KERSEY, Terry W. et al, Comparison of intradermal and subcutaneous injections in lymphatic mapping, Journal of Surgical Research, 2001, Vol. 96, pp255-259, 全文, 特に第255頁Abstract	1-4
Y	JP 4-506078 A(アライアンス・ファーマステイカル・コーポレーション)1992.10.22, 全文, 特に請求項1-21, 第2頁左下欄-第3頁左上欄, 第5頁右上欄 & WO 90/14846 A1	1-4

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

07.05.2004

## 国際調査報告の発送日

25.5.2004

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)  
小堀 麻子

4C 2938

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き)	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	TAFRA, Lorraine <i>et al</i> , Filtered versus unfiltered technetium sulfur colloid in Lymphatic mapping: a significant variable in a pig model, Annals of Surgical Oncology, 1999, Vol. 6, pp83-87, 全文	1-4
A	JP 7-509467 A(ザ ゼネラル ホスピタル コーポレーション) 1995. 10. 19, 全文 & WO 94/02068 A1	1-4

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 5 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲5は診断による人体の処置方法に関するものであり、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。